·论　著·

二甲双胍通过 PP2A/Tau 信号通路延缓海马神经元细胞衰老的机制研究

孟冉，侯文杰，徐俊松，禹翔，郑伟

【摘要】目的　探讨二甲双胍（Met）通过蛋白磷酸酶 2A（PP2A）/Tau 信号通路对高糖诱导的海马神经元细胞衰老的影响。方法　将人海马神经元细胞暴露于不同浓度高糖（25、45、65、85 mmo/L）环境下，选取最适宜构建衰老模型的浓度。采用不同浓度 Met（0、0.1、1、20、50 μmol/L）干预衰老海马神经元细胞，选取最佳 Met 浓度。利用半乳糖苷酶（SA-β-Gal）染色、CCK 细胞增殖能力检测评估不同浓度高糖和 Met 对衰老海马神经元实验细胞的影响；选取最适宜高糖和最佳 Met 浓度干预后的衰老海马神经元细胞，Weston Blot 检测细胞 PP2A、Tau 蛋白水平的变化。结果　（1）葡萄糖浓度为 45 mmo/L 时，海马神经元细胞有明显增殖抑制，细胞呈大而扁平、空泡化增多的典型衰老样态，衰老标志 SA-β-gal 阳性细胞数量明显增加。衰老神经元细胞 PP2A 活性下降，Tau 蛋白表达增高（均 $P < 0.05$）。选取该浓度构建细胞衰老模型。（2）10 μmol/L Met 干预下，衰老海马神经元细胞增殖能力有所恢复，SA-β-gal 染色阳性的细胞减少。衰老神经元细胞 PP2A 活性增高，Tau 蛋白表达下降（均 $P < 0.05$）。结论　Met 能延缓高糖诱导的海马神经元细胞衰老，其机制可能与上调 PP2A，降低 Tau 蛋白表达有关。

【关键词】　二甲双胍；高糖诱导；海马神经元细胞；衰老；PP2A/Tau 通路
DOI:10.3969/j.issn.1671-0800.2026.07.003
【中图分类号】　R587.1；R741.02　　【文献标志码】　A　　【文章编号】　1671-0800(2026)07-0708-05

Metformin delays high glucose-induced hippocampal neuron senescence *via* the PP2A/Tau pathway

Meng Ran, Hou Wenjie, Xu Junsong, Yu Xiang, Zheng Wei (No.903 Hospital of Joint Logistic Support Force, 310000 Hangzhou, Zhejiang, China)

【Abstract】Objective　Investigation of the impact of metformin (Met) on high-glucose-induced senescence in hippocampal neuronal cells *via* the protein phosphatase 2A (PP2A)/Tau signaling pathway. **Methods**　Exposing hippocampal neuronal cells to different concentrations of high glucose (25, 45, 65, 85 mmol/L) identified the optimal concentration for establishing an aging model. The effects of various Met concentrations (0, 0.1, 1, 20, 50 μmol/L) on aged hippocampal neurons were evaluated to determine the most effective Met concentration. The impact of different glucose and Met concentrations on experimental hippocampal neuronal cells was assessed using senescence-associated β-galactosidase (SA-β-Gal) staining and cell count kit (CCK) cell proliferation assays. After selecting the most suitable high-glucose concentration and optimal Met concentration for intervention, changes in PP2A and Tau protein levels in the treated aged hippocampal neurons were analyzed by Western blot. **Results**　(1) At a glucose concentration of 45 mmol/L, hippocampal neuronal cells exhibited significant proliferation inhibition, showing typical aging characteristics such as enlarged, flattened morphology and increased vacuolization, along with a marked increase in the number of SA-β-gal positive cells. In aged neurons, PP2A activity decreased while Tau protein expression increased (all $P < 0.05$). This concentration was selected to establish a cellular aging model. (2) Under intervention with 10 μmol/L Met, the proliferative capacity of aged hippocampal neurons partially recovered, and the number of SA-β-gal positive cells decreased. PP2A activity increased and Tau protein expression decreased in aged neurons (all $P < 0.05$). **Conclusions**　Methionine has the potential to delay senescence in hippocampal neuronal cells induced by high

基金项目：　杭州市医药卫生科技计划项目（B20240809）
作者单位：　310000 杭州，中国人民解放军联勤保障部队第九〇三医院
通信作者：　郑伟，Email：zhwei903@163.com

glucose levels, possibly through mechanisms involving the upregulation of PP2A activity and the downregulation of Tau protein expression.

【Key words】 Metformin; High glucose-induced; PP2A/Tau pathway; Hippocampal neuron senescence

[Modern Practical Medicine,2026,38(7):708-712]

以阿尔茨海默病（Alzheimer’s disease，AD）为代表的慢性神经退行性疾病（chronic neurodegenerative diseases，CND）发病率呈逐年上升趋势。现有研究表明，神经元退变、衰老、丢失和死亡是驱动此类疾病发生发展的核心环节[1-2]。细胞衰老的分子机制涉及 DNA 与基因组不稳定、端粒缩短、表观遗传修饰异常、蛋白质稳态失衡、细胞衰老、干细胞衰竭以及细胞间通讯紊乱等多个层面。这些改变不仅发生在细胞与分子水平，亦可累及组织器官层面[3]，进而损害器官功能及损伤后修复。因此，靶向衰老细胞已成为防治衰老相关疾病的重要策略。近年来研究证实，二甲双胍（metformin，Met）在延缓机体衰老方面展现出良好潜力，成为衰老干预领域极具前景的候选药物[4]，其作用机制包括增强细胞自噬、改善细胞间通讯、延缓干细胞衰老、调控能量代谢、减轻端粒耗损及抑制细胞衰老表型等。蛋白磷酸酶 2A（protein phosphatase 2A，PP2A）作为丝/苏氨酸蛋白磷酸酶家族的核心成员，参与调控细胞凋亡、基因转录、蛋白翻译、信号转导、细胞周期进程等多种关键生命活动[5]。Met 可通过激活 PP2A 发挥抗衰老作用。有研究发现，Met 能够显著降低高糖刺激下心肌细胞的凋亡率与氧化应激水平，且该保护效应依赖于 PP2A 的活性[6]；同时，Met 还可通过激活 PP2A 抑制微囊藻毒素-LR 介导的 tau 蛋白过度磷酸化，从而减轻 AD 样病理改变[7]。本研究通过构建高糖诱导的海马神经元细胞衰老模型，探讨 Met 对神经元衰老相关损伤的保护作用与分子机制，现报道如下。

1　材料与方法

1.1　主要试剂　人海马神经元细胞（HPPNCs）购于上海创赛科技有限公司，葡萄糖购于天津风船化学试剂科技有限公司，β-半乳糖苷酶（SA-β-Gal）购于广州威佳科技有限公司，CCK8 试剂盒（C0037）购于上海碧云天生物技术有限公司，PP2A 购自美国 Santa Cruz 公司，β-actin 抗体、p-Tau、P53 抗体及辣根过氧化酶标记的抗兔、抗鼠二抗购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养　将正常生长于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液中的 HPPNCs 细胞置于 37 ℃、含 5% CO_2 的培养箱中。

1.2.2　细胞处理与分组　（1）高糖诱导衰老模型：HPPNCs 细胞分别暴露于 25 mmol/L（Control 组）、45 mmol/L（45mM 组）、65 mmol/L（65mM 组）、85 mmol/L（85mM 组）浓度高糖环境下 48 h；（2）Met 干预：45 mmol/L 高糖诱导的衰老海马神经元分别暴露于 0 μmol/L（Met0 组）、0.1 μmol/L（Met0.1 组）、1 μmol/L（Met1 组）、10 μmol/L（Met10 组）、50 μmol/L（Met50 组）浓度的 Met 24 h。

1.2.3　β-半乳糖苷酶（SA-β-Gal）染色法检测细胞衰老　移除细胞培养基后加入 1 mL SA-β-Gal 染色固定液，室温固定 15 min。去除固定液后加入 1 mL 染色工作液，置于 37 ℃培养箱中孵育过夜。显微镜观察染色结果，衰老细胞呈现深蓝色染色，阴性细胞无染色。每组随机计数 100 个细胞中的阳性细胞数量，并计算阳性细胞率（%）。实验独立重复 3 次。

1.2.4　CCK-8 检测细胞增殖　胰蛋白酶消化处于对数生长期的细胞，制备细胞悬液，以每孔 8 000 个细胞接种于 96 孔板中。将细胞分为 4 组，每组设 5 个复孔（n=5）。待细胞贴壁后，加入相应培养基继续培养。检测时，每孔加入 100 μL 10% CCK-8 溶液，37 ℃孵育 1 h 后测定光密度值 D（450 nm）。

1.2.5　蛋白质印迹法检测蛋白表达水平　Control 组、45mM 组、Met0 组、Met10 组细胞经 37 ℃下无菌 PBS 洗涤 3 次后，加入细胞裂解缓冲液、蛋白酶抑制剂 PMSF 及磷酸酶抑制剂混合物。刮取细胞收集后置于冰上裂解 30 min，随后使用低速离心机以 12 000 r/min 转速在 4 ℃离心 10 min。收集上清液后采用 BCA 法测定蛋白浓度。定量蛋白按总体积 1/5 加入 5× SDS-PAGE 上样缓冲液充分混匀，100 ℃变性 15 min。蛋白质样品经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转印至 PVDF 膜，并用封闭液封闭。分别加入抗 PP2A 特异

性抗体、总 Tau 抗体、p-Tau 位点特异性抗体、抗 P53 衰老标志物抗体及内参β-Actin 抗体于 4 ℃摇床孵育过夜，辣根过氧化物酶标记的对应种属 IgG 二抗室温孵育 1 h，膜片依次洗涤 3 次，每次 15 min。曝光显影操作使用 ECL 显影仪完成。

1.3　统计方法　采用 GraphPad 8.0 软件进行绘图。计量资料用均数±标准差表示，两组间比较采用独立样本 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析。$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　不同浓度葡萄糖对 HPPNCs 细胞活性的影响

2.1.1　细胞衰老　Control 组细胞排列紧密，形态较为完整且均匀，蓝色染色信号较少，大部分细胞未表现明显衰老；45 mM 组细胞数量相似，但可见较多蓝色斑点，部分细胞呈现蓝色着色，衰老细胞开始增多；65 mM 组蓝色染色显著增多，细胞体积有轻微变大与形态变化，衰老细胞比例明显升高；85 mM 组细胞明显稀疏，细胞形态变得不规则，蓝色染色集中且强烈，大部分细胞处于衰老状态，细胞有较严重的损伤或死亡趋势，见图 1。

2.1.2　细胞增殖能力　不同浓度葡萄糖处理后海马神经元相对增殖率差异有统计学意义（F=166.21，$P < 0.05$），各组间相对增殖率差异均有统计学意义（均 $P < 0.05$）。65 mM 组和 85 mM 组细胞增殖能力显著降低，见图 2。

结合 SA-β-gal 染色及细胞增殖情况，45 mmol/L 葡萄糖为诱导海马神经元细胞衰老的最适浓度，选取此浓度建立海马神经元细胞衰老模型。

2.2　高糖对衰老相关蛋白表达水平的影响　45mM 组 P53、p-Tau 蛋白表达水平均高于 Control 组，PP2A 低于 Control 组（均 $P < 0.05$），见图 3。

2.3　不同浓度 Met 对衰老 HPPNCs 细胞活性的影响

2.3.1　细胞衰老　Met0 组细胞可见较多蓝色斑点，部分细胞呈现蓝色着色，细胞衰老水平较高；Met0.1 组蓝色染色情况及整体细胞形态较 Met0 组变化不大，衰老细胞比例未见明显改变；Met1 组蓝色斑点明显减少，细胞形态较前健康且数量未见明显减少，提示此浓度下 Met 可能有抑制衰老的作用；Met10 组蓝色染色水平较低，细胞形态未见明显异常，衰老标志物表达较低，进一步支持抗衰老效果；Met50 组虽然细胞衰老染色不多，但是细胞数量减少，形态开始紊乱，显示该浓度 Met 对细胞有一定毒性和损伤，见图 4。

2.3.2　细胞增殖能力　不同浓度 Met 干预后细胞相对增殖率差异有统计学意义（F= 18.73，$P < 0.05$）。Met10 组、Met50 组细胞增殖能力均高于 Met0 组（均 $P < 0.05$），见图 5。

2.4　Met 对衰老细胞 PP2A、Tau 蛋白表达水平的影响　Met10 组 p-Tau 蛋白相对表达水平低于 Met0 组（$P < 0.05$）。PP2A 蛋白相对表达水平高于 Met0 组（$P < 0.05$），见图 6。

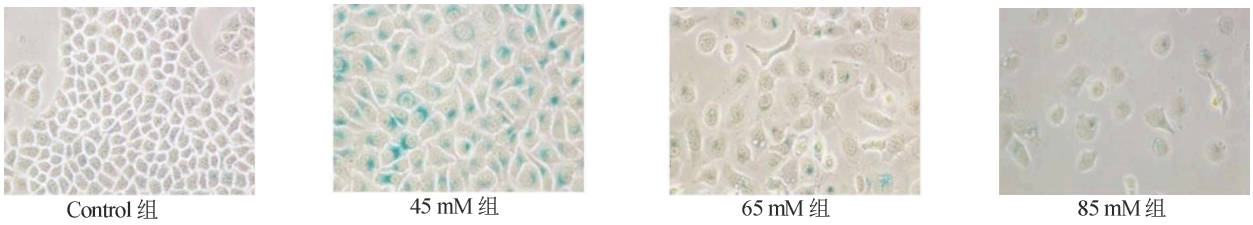
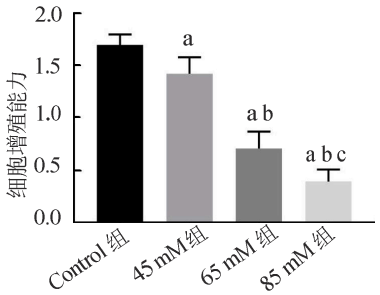
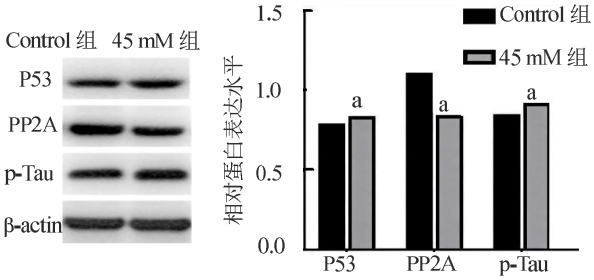


图 1　不同浓度葡萄糖诱导海马神经元细胞衰老（SA-β-Gal 染色，×200）



注：与 Control 组相比，a$P < 0.05$；与 45 mM 组相比，b$P < 0.05$；与 65 mM 组相比，c$P < 0.05$

图 2　不同浓度高糖诱导海马神经元细胞衰老细胞增殖结果比较



注：与 Control 组相比，a$P < 0.05$。PP2A 为蛋白磷酸酶 2A

图 3　高糖诱导海马神经元细胞衰老相关蛋白表达

3　讨论

葡萄糖作为人体主要的能量底物，广泛参与中枢神经系统生理过程。但持续高血糖状态可加剧细胞内氧化应激和炎症反应，抑制细胞增殖与存活，诱发细胞功能障碍并促进细胞衰老[8]。研究发现[9]，葡萄糖代谢状态直接影响神经元功能。糖尿病患者脑葡萄糖摄取与利用异常，可加速海马神经元细胞衰老进程。Meta 分析发现[10]，慢性高糖可改变前额叶-小脑网络结构，导致语言和空间视觉功能障碍。越来越多的研究表明，糖尿病可显著增加认知衰退、轻度认知障碍和痴呆症的发生风险[11]。空腹血糖升高与纹状体、海马体体积缩小显著相关[12]，且海马是糖尿病患者早期最先受累的脑区[13]。这提示高糖可通过神经毒性作用诱导神经元细胞衰老，加速年龄相关性神经元细胞损伤。

目前关于诱导海马神经元衰老的体外建模浓度尚无统一标准，多数研究采用高糖培养基模拟糖尿病或高血糖状态下的神经毒性。许永劼等[14]用 45 mmol/L 高糖成功构建糖尿病脑病细胞模型。Song 等[15]采用 200 mmol/L 高糖诱导神经元细胞衰老，可见细胞活力下降、SA-β-Gal 阳性率升高。本研究结果显示高糖对细胞生长呈显著浓度依赖性抑制。45 mmol/L 葡萄糖可显著降低细胞活力，但仍保留 80%以上细胞存活率，同时，SA-β-gal 阳性细胞明显增多，出现细胞增大、扁平化及空泡化等典型衰老形态；进一步升高葡萄糖浓度，则阳性染色率和细胞密度均下降，提示细胞趋向凋亡。因此，本研究选取 45 mmol/L 作为构建 HPPNCs 细胞衰老模型的适宜浓度。

Tau 蛋白过度磷酸化是 AD 的核心病理特征，而 PP2A 是介导 Tau 去磷酸化的关键磷酸酶，其活性下降与 Tau 蛋白磷酸化失衡密切相关。动物实验显示，老年 2 型糖尿病小鼠海马区出现 Tau 蛋白过度磷酸化、Aβ水平升高等 AD 样病理改变[16]，可能与高糖及胰岛素信号异常削弱 AKT-1 通路、下调胰岛素受体底物-2 的表达有关[17]。胰岛素缺乏可抑制 PP2A 进而促进 Tau 蛋白过度磷酸化，为糖尿病与 AD 高共病率提供了分子关联[18]。高糖还可破坏淀粉样前体蛋白代谢与 Tau 蛋白过度磷酸化调控，导致突触缺陷和认知障碍[19]。这提示抑制 PP2A、诱导 Tau 蛋白过度磷酸化是高糖介导神经损伤的重要机制。本研究结果显示，45 mmol/L 高糖处理后，HPPNCs 细胞衰老相关蛋白 P53、p-Tau 蛋白表达水平显著升高，PP2A 蛋白表达水平显著降低，这提示 PP2A/Tau 信号失衡参与了高糖诱导的神经元衰老调控。

Met 可调控炎症、自噬及细胞衰老等多种增龄相关病理生理过程。研究表明，Met 可通过增强 PP2A 活性降低高糖刺激下心肌细胞凋亡和氧化应激[6]，并可通过 mTOR 依赖方式激活 PP2A 与 GSK-3β，抑制 Tau 蛋白过度磷酸化，减轻 AD 样病理表型[7]。这提示 Met 可能通过激活 PP2A 发挥抗衰老、抗炎及抗氧化作用。本研究采用不同浓度 Met 干预高糖诱导

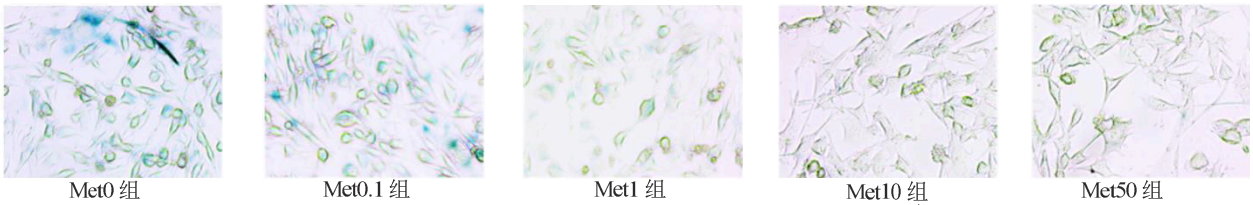
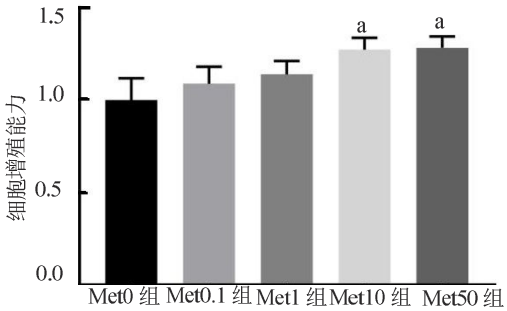
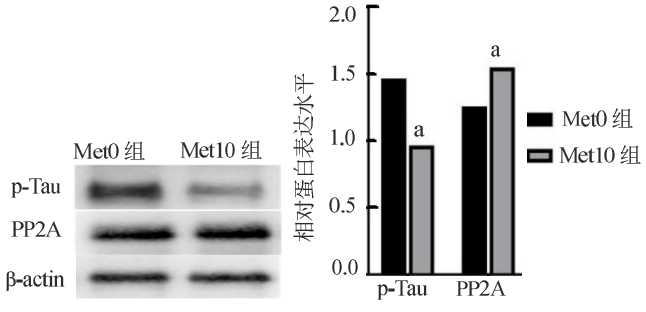


图 4　不同浓度二甲双胍(Met)干预后衰老海马神经元细胞(SA-β-Gal 染色，×200)



注：与 Met0 组相比，a$P < 0.05$

图 5　不同浓度二甲双胍(Met)干预衰老细胞后增殖能力比较



注：与 Control 组相比，a$P < 0.05$。PP2A 为蛋白磷酸酶 2A

图 6　二甲双胍(Met)对衰老海马神经元细胞 PP2A、Tau 蛋白水平的影响

的 HPPNCs 衰老细胞模型，结果显示 Met 可浓度依赖性改善细胞衰老表型，SA-β-gal 阳性细胞显著减少，以 10 μmol/L 效果最显著。50 μmol/L 时抗衰老作用趋于平稳，并出现细胞数量减少、形态紊乱，提示高浓度可能产生细胞毒性。这与高剂量 Met 抑制线粒体呼吸链复合物Ⅰ、引发乳酸积聚及线粒体功能障碍有关[20]，且其抗增殖与促凋亡效应可随代谢微环境改变而呈现差异。因此，本研究选用 10 μmol/L 作为最佳干预浓度，进一步蛋白检测显示，10 μmol/L 可显著上调 PP2A 表达水平，并降低 p-Tau 表达水平，证实 Met 可通过调控 PP2A/Tau 通路延缓高糖诱导的海马神经元细胞衰老。

综上所述，Met 通过上调 PP2A、抑制 Tau 蛋白过度磷酸化发挥神经保护作用的直接分子机制，填补了“高糖应激-神经元衰老-Met 干预-PP2A/p-Tau 通路”的研究链条，为“老药新用”提供新的实验支撑。本研究不仅深化了高糖诱导神经元衰老的分子机制，更为糖尿病合并认知障碍的防治提供了安全、可及的干预靶点与策略，具有重要的基础研究价值与临床转化意义。后续需在动物模型与临床研究中进一步验证，并深入探索其与 AMPK 等相关通路的交互作用，完善抗衰机制网络。

利益冲突　所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明　孟冉：酝酿和设计实验，实施研究，采集数据，分析/解释数据，起草文章，获取研究经费；侯文杰：酝酿和设计实验，实施研究，分析/解释数据，统计分析；徐俊松：实施研究，采集数据，对文章的知识性内容作批评性审阅；禹翔：采集数据，对文章的知识性内容作批评性审阅，统计分析；郑伟：分析/解释数据，对文章的知识性内容作批评性审阅，指导

参　考　文　献

[1] Verma V, Rao L, Chaudhary M, et al. Spirilloxanthin from Verbesina encelioides flower extract has neuroprotective benefits in scopolamine-induced memory impaired rats that resemble Alzheimer's disease[J]. Mol Neurobiol, 2025, 62(10): 12602-12615.

[2] Lanjewar D, Katariya R, Kale V, et al. Interplay of neuropeptide Y and autophagy in Alzheimer's disease: Therapeutic perspectives and mechanistic insights[J]. Neuropeptides, 2025, 113: 102547.

[3] Ivko OM. Peptide regulation of cellular aging[J]. Adv Gerontol, 2024, 37(5):508-515.

[4] Kulkarni A S, Gubbi S, Barzilai N. Benefits of metformin in attenuating the hallmarks of aging[J]. Cell Metab, 2020, 32(1): 15-30.

[5] Neale D A, Morris J C, Verrills N M, et al. Understanding the regulatory landscape of protein phosphatase 2A (PP2A): Pharmacological modulators and potential therapeutics[J]. Pharmacol Ther, 2025, 269: 108834.

[6] Cheng G, Li L H. High-glucose-induced apoptosis, ROS production and pro-inflammatory response in cardiomyocytes is attenuated by metformin treatment *via* PP2A activation[J]. J Biosci, 2020, 45(1): 126.

[7] Zhang Y L, Fan X, Su Z Y, et al. Pretreatment with metformin prevents microcystin-LR-induced tau hyperphosphorylation *via* mTOR-dependent PP2A and GSK-3β activation[J]. Environ Toxicol, 2021, 36(12): 2414-2425.

[8] Zou Y C, Gao K, Cao B T, et al. Syringin protects high glucose-induced BMSC injury, cell senescence, and osteoporosis by inhibiting JAK2/STAT3 signaling[J]. J Appl Biomed, 2024, 22(4): 197-207.

[9] Wu S X, Liang X L, Zhu Q Q, et al. Altered hippocampal subfield volumes are associated with memory and executive function in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. World J Diabetes, 2025, 16(7):104424.

[10] He D, Hao Z Q, Zhao M Q, et al. Structural and functional brain abnormal alteration in patients with type 2 diabetes mellitus: A coordinate-based meta-analysis[J]. Transl Psychiatry, 2025, 15: 269.

[11] Bloomgarden Z. Diabetes and Alzheimer's disease[J]. J Diabetes, 2025, 17(5): e70103.

[12] Zhang T Q, Shaw M, Humphries J, et al. Higher fasting plasma glucose is associated with striatal and hippocampal shape differences: The 2sweet project[J]. BMJ Open Diabetes Res Care, 2016, 4(1): e000175.

[13] Gold S M, Dziobek I, Sweat V, et al. Hippocampal damage and memory impairments as possible early brain complications of type 2 diabetes[J]. Diabetologia, 2007, 50(4): 711-719.

[14] 许永劼,李程程,朱金凤,等.高糖诱导大鼠海马神经元细胞模型建立及细胞凋亡的影响[J].中风与神经疾病杂志,2019,36(1):28-32.

[15] Song J, Lee B, Kang S, et al. Agmatine ameliorates high glucose--induced neuronal cell senescence by regulating the p21 and p53 signaling [J]. Exp Neurobiol, 2016, 25(1): 24-32.

[16] Mehla J, Chauhan B C, Chauhan N B. Experimental induction of type 2 diabetes in aging-accelerated mice triggered Alzheimer-like pathology and memory deficits[J]. J Alzheimers Dis, 2014, 39(1): 145-162.

[17] Ochiai T, Sano T, Nagayama T, et al. Differential involvement of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 in brain insulin signaling is associated with the effects on amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. Neurobiol Dis, 2021, 159: 105510.

[18] Gratuze M, Julien J, Petry F R, et al. Insulin deprivation induces PP2A inhibition and tau hyperphosphorylation in hTau mice, a model of Alzheimer's disease-like tau pathology[J]. Sci Rep, 2017, 7: 46359.

[19] Chae C W, Choi G E, Jung Y H, et al. High glucose-mediated VPS26a down-regulation dysregulates neuronal amyloid precursor protein processing and tau phosphorylation[J]. British J Pharmacology, 2022, 179(15): 3934-3950.

[20] See K C. Metformin-associated lactic acidosis: A mini review of pathophysiology, diagnosis and management in critically ill patients[J]. World J Diabetes, 2024, 15(6): 1178-1186.

收稿日期：2026-02-26

（本文编辑：孙海儿）